

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005852

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-144405
Filing date: 14 May 2004 (14.05.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 09 June 2005 (09.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 5月14日

出願番号 Application Number: 特願2004-144405

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

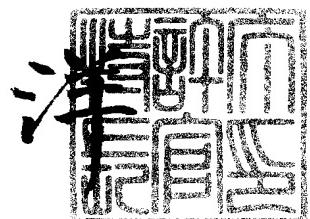
出願人 Applicant(s): 不二製油株式会社

J P 2004-144405

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2005年 5月25日

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PP14490MW
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A23J 3/16
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府泉佐野市住吉町1番地不二製油株式会社阪南事業所内
 【氏名】 加藤 裕之
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府泉佐野市住吉町1番地不二製油株式会社阪南事業所内
 【氏名】 坂田 哲夫
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府泉佐野市住吉町1番地不二製油株式会社阪南事業所内
 【氏名】 勝丸 裕子
【特許出願人】
 【識別番号】 000236768
 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号
 【氏名又は名称】 不二製油株式会社
 【代表者】 浅原和人
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 029377
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

脱脂豆乳又はその酸沈カードをアルカリ金属化合物で中和した物にトランスグルタミナーゼを作用させた後、100℃～200℃で20秒～80秒加熱することを特徴とする大豆蛋白の製造法。

【請求項 2】

トランスグルタミナーゼの作用の程度が、トランスグルタミナーゼ反応後Glu-Lysの結合数が、蛋白質1g当たり10の10乗～10の25乗個存在する請求項1の製造法。

【請求項 3】

請求項1又は請求項2のいずれかの方法により製造された大豆蛋白及び肉原料を混合成型し、加熱することを特徴とする肉加工食品の製造法。

【書類名】明細書

【発明の名称】大豆蛋白の製造法及びこの大豆蛋白を用いた肉加工食品の製造法

【技術分野】

【0001】

この発明は、肉加工食品に練り込むのに適した粉末状の大豆蛋白の製造法及びこれを利用した肉加工食品の製造法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来より、かまぼこ、ちくわ、ハム・ソーセージなどの魚肉練製品、蓄肉加工食品はコスト安定化や歩留り向上等の理由から、大豆蛋白に代表される植物性蛋白で魚肉、蓄肉の一部を代替し使用することが行われてきた。その際、大豆蛋白の求められる機能としてゲル化力や乳化力等がある。

【0003】

一方、トランスグルタミナーゼを利用して食用蛋白を架橋改質するなどの方法が知られている。この酵素は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。このトランスグルタミナーゼは、アシル受容体としてのタンパク質中のリジン残基の ϵ -アミノ基に作用し、タンパク質分子の分子内において及び分子間において $\epsilon-(\gamma-Glu)-Lys$ 架橋結合を形成する。また、水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されてグルタミン酸残基になる反応を進行させる。

トランスグルタミナーゼの大豆蛋白に対する態様に関しては、特許文献1や特許文献2にみられるように、トランスグルタミナーゼを使用して蛋白のゲル物性を改良し、これらのゲルにかたさや弾力性を付与してきた。

【0004】

しかし、大豆蛋白製造工程において、単にトランスグルタミナーゼを利用して蛋白のゲル物性を上げるだけでは、ソーセージなどの肉加工食品において大豆蛋白の機能（ゲル化力や乳化力など）を発揮することはできない。これは、大豆蛋白の乳化性は向上しないからと解される。

換言すれば、本発明者等の研究の結果、従来のようなトランスグルタミナーゼを利用した大豆蛋白は、ゲル物性は向上するものの、乳化性は逆に低下し、ソーセージ等の肉加工食品の食感が硬くなる物性は向上しないという知見を得ている。

【0005】

ところで、通常大豆蛋白製造における殺菌工程は、これに伴う蛋白変性によるゲル物性低下を極力抑えるために、殺菌に必要な最低限の熱履歴しかかけないのが通例である。下記引用文献7に開示の発明には、トランスグルタミナーゼを作用させた大豆蛋白溶液を加熱殺菌しているが、特許文献3では120℃で10秒が実施例に開示されている。一方、特許文献4ではかかる殺菌温度より高い温度処理をトランスグルタミナーゼ処理した大豆蛋白に加えている。ここでは70～200℃で2秒～10分好ましくは100～150℃、5秒～5分が開示されている。

しかし、ここでの大豆蛋白はCaなどのアルカリ土類金属で凝固し豆腐のように不溶化しカーボン化した大豆蛋白でありいくらトランスグルタミナーゼを作用させて可溶化させゲル化力を回復させたとしても、たとえ色調は白くなるかもしれないが、ゲル化力も乳化力も低いものであり、本願発明のような水溶性でゲル化力と乳化力を兼ね備えるものではない。

以上のように、特許文献3や特許文献4に開示の技術では大豆蛋白のトランスグルタミナーゼ反応により低下する乳化力を十分に補うことは極めて困難である。

【0006】

【特許文献1】特開昭58-149645号公報

【特許文献2】特開平1-27471号公報

【特許文献3】特開平2-257831号公報

【特許文献4】特開平4-63548号公報

【特許文献5】特公平1-50382号公報

【特許文献6】特開平1-300889号公報

【非特許文献1】Kumazawa, Y., Seguro, K., Takamura, M., and Motoki, M. (1993) J. Food Sci. 58, 1062-1065.

【非特許文献2】最新医学, 21, 622-627(1966)

【非特許文献3】「昭和63年度日本水産学会秋期大会講演要旨集」167頁

【非特許文献4】「平成2年度日本水産学会春季大会講演要旨集」219頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

この発明は、トランスグルタミナーゼを利用してゲル化力及び乳化力を向上させた大豆蛋白を得ることを目的とした。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者等は、上記課題を解決すべく銳意研究を重ねた結果、脱脂豆乳または該豆乳を等電沈殿させて回収した酸沈殿カードを中和して得た大豆蛋白溶液、これら溶液にトランスグルタミナーゼを特定の反応状態まで作用させた後、特定熱履歴の高熱履歴の殺菌処理を施すことにより上記課題を解決できることを見出し本発明を完成するに到った。

【0009】

即ち、本発明は、脱脂豆乳又はその酸沈カードをアルカリ金属化合物で中和した物にトランスグルタミナーゼを作用させた後、100°C～200°Cで20秒～80秒加熱することを特徴とする大豆蛋白の製造法である。

トランスグルタミナーゼの作用の程度は、トランスグルタミナーゼ反応後Glu-Lysの結合数が、蛋白質1g当たり10の10乗～10の25乗個存在するようにすることが好ましい。

また、本発明は上記の方法により製造された大豆蛋白及び肉原料を混合成型し、加熱することを特徴とする肉加工食品の製造法である。

【発明の効果】

【0010】

本発明の方法により、ソーセージのような畜肉加工食品に用いた場合にでも、そのゲル化力及び乳化力を同時に発揮して畜肉加工食品の物性（食感など）を向上させる大豆蛋白の製造が可能となったものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

まず、本発明の大豆蛋白の製造法について説明する。

本発明は、脱脂豆乳又はその酸沈カードをアルカリ金属化合物で中和した物にトランスグルタミナーゼを作用させた後、100°C～200°Cで20秒～80秒加熱することを特徴とする大豆蛋白の製造法である。トランスグルタミナーゼの作用の程度は、トランスグルタミナーゼ反応後Glu-Lysの結合数が、蛋白質1g当たり 10×10^6 ～ 10×10^{25} 個存在するようにするのが好ましい。

【0012】

本発明に用いる脱脂豆乳又はその酸沈カードをアルカリ金属化合物で中和した物について説明する。脱脂大豆に加水してスラリーとなし、おからを除去して脱脂豆乳を得ることができる。脱脂大豆は、大豆から大豆油を圧搾、溶剤抽出した残りの低変性脱脂大豆を用いることができる。

該豆乳を等電沈殿させてホエーを除き沈殿した大豆蛋白を中和して大豆蛋白溶液とすることが出来る。ここで中和に用いるアルカリがNaOHやKOHのようなアルカリ金属化合物であることが重要である。Ca(OH)₂やMg(OH)₂のようなアルカリ土類金属化合物は大豆蛋白を豆腐のように凝固させる作用があり、後のトランスグルタミナーゼ処

理や高温加熱処理を行ってもゲル化力もある程度しか回復せず乳化力も回復しないので好ましくない。

【0013】

本発明において、上記のように脱脂豆乳又は大豆蛋白溶液にトランスグルタミナーゼを作用させるが、そのトランスグルタミナーゼの作用の程度が、トランスグルタミナーゼ反応後Glu-Lysの結合数が、蛋白質1g当たり 10×10 乗～ 10×25 乗個、好ましくは 10×15 乗～ 10×21 乗個存在するようにすることが適当である。少なすぎるとゲル物性の向上が十分でなく、多すぎるとゲル物性向上を逆に阻害するだけでなく乳化力をも大きく低下させる。

ここに、トランスグルタミナーゼの作用の程度を測定する方法としては、トランスグルタミナーゼの結合数を測定する方法として、大豆蛋白をGly-Lys結合だけが残存するようプロテアーゼ分解させた後、HPLCによる定量を行うか（非特許文献1）、もしくはトランスグルタミナーゼ反応の際、Gly-Lys結合に伴いこの結合1個に対しアンモニアを1分子遊離させるため、このアンモニアを定量してGlu-Lys結合数を算出する方法がある。本発明者等は市販されているキットを利用することが出来るので後者の方法を採用した。具体的には、まずトランスグルタミナーゼ反応中和液に除蛋白試薬を加えて除蛋白することにより、呈色阻害成分除去と同時にトランスグルタミナーゼを含めた諸酵素を失活させる。この上清に、フェノール、ペンタシアノニトロシル鉄(III)酸ナトリウムを加え、さらにアルカリ性とした後、次亜塩素酸ナトリウムで酸化すると、インドフェノールを生成して青色を呈する。この青色の吸光度を測定することで試料中のアンモニア窒素濃度を求める（非特許文献2）。この濃度より、Gly-Lys結合1個に対しアンモニアを1分子遊離させることを考慮し、トランスグルタミナーゼによるGlu-Lysの結合数を算出する。

【0014】

上記の程度のようなトランスグルタミナーゼを作用させるには、脱脂豆乳や大豆蛋白溶液に加えるトランスグルタミナーゼの量や作用温度、pH、時間を調整することが出来る。例えば、トランスグルタミナーゼの量は脱脂豆乳の粗蛋白質1gあたり0.01～100ユニット(U)という広範な範囲を使用しうるが、好ましくは0.05～0.7Uが適当であり、100Uを超える場合には反応制御が困難になる。トランスグルタミナーゼを作用させる温度は0～80℃、好ましくは40～60℃が適当である。トランスグルタミナーゼの作用時間は0.01～120分、好ましくは1～60分が適当である。反応時間が極端に短い場合には、充分な反応効果が得られず、長い場合には反応液の粘度が上昇するだけでなく、溶液中に菌の増殖を誘発し、腐敗する恐れがある。

【0015】

本発明に用いるトランスグルタミナーゼには、カルシウム非依存性のものとカルシウム依存性のものがある。前者の例としては微生物由来のもの（例えば、特許文献2参照）をあげることができる。後者の例としてはモルモット肝臓由来のもの（特許文献5参照）、魚由来のもの（例えば、非特許文献3及び非特許文献4参照）をあげることができる。この他、遺伝子組み替えにより製造されるもの（特許文献6参照）等、いずれのトランスグルタミナーゼでも用いることができ、起源及び製法に限定されることはない。但し、機能性及び経済性の点から、好ましくはカルシウム非依存性のものが適当であり、上述の微生物由来のトランスグルタミナーゼ（特許文献2）は、その例である。

【0016】

尚、本発明でいうトランスグルタミナーゼの活性単位は、次のようにして測定され、かつ定義される。即ち、ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを基質として反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロル酢酸存在下で鉄錯体を形成させた後、525nmの吸光度を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め、活性を算出する（特許文献2参照）。

【0017】

以上のようにトランスグルタミナーゼを作用させて、目的とするGlu-Lys結合数を得ることが肝要であり、トランスグルタミナーゼの反応条件は目的のGlu-Lys結合数を得るた

めに適宜調整することが出来る。本発明はかかる程度のトランスグルタミナーゼを作用させることだけで目的の大豆蛋白を得ることは出来ず、次に述べる高温加熱処理と組み合わせることによってはじめて目的の大豆蛋白を得ることが出来るものである。

【0018】

この加熱は、100℃～200℃で20秒～80秒、好ましくは130℃～160℃で30秒～60秒で行うことが出来る。即ち、トランスグルタミナーゼを作用させることによっていったん大豆蛋白の ϵ -(γ -Glu)-Lys架橋結合するなどして大豆蛋白を架橋改質した後、強度の加熱により大豆蛋白を熱変性させてその高次構造を変化させることによりゲル化力と乳化力を發揮させるものである。このため、本発明における高温加熱の程度は通常殺菌に利用される加熱温度条件より過酷なものである。

この加熱処理は前記のように100℃～200℃で20秒～80秒、好ましくは130℃～160℃で30秒～60秒、間接加熱、直接蒸気吹き込み加熱など利用することができるが、好ましくは直接蒸気吹き込み加熱が適當である。加熱が弱いと蛋白への熱変性が十分でなく、逆に強すぎると熱変性が強すぎて逆に物性（ゲル化力や乳化力）低下といった悪影響を受ける。特に、加熱時間は重要でありたとえ高温でも短時間であれば目的の効果は得られない。

【0019】

以上のように特定の程度のトランスグルタミナーゼの作用と特定程度の高温加熱の組み合わせによってはじめてゲル化力と乳化力の両方に優れた大豆蛋白を得ることが出来るものである。即ち、トランスグルタミナーゼ作用と加熱変性のいずれの条件が欠けても大豆蛋白のゲル化力と乳化力を同時に満足することが出来ない。

換言すれば、前記加熱処理を行わない、もしくは加熱が不十分であると、たとえトランスグルタミナーゼを作用させても得られる分離大豆蛋白のゲル化力は十分でも、乳化力が大きく低下し、ソーセージ等の畜肉加工食品に利用した場合に分離大豆蛋白としての機能（ゲル化力と乳化力）を發揮できなくなってしまう。

【0020】

本発明において、トランスグルタミナーゼを反応させて高熱履歴加熱をさせた脱脂豆乳酸沈カードまたはその中和物は、公知の噴霧乾燥などの乾燥手段を利用して乾燥して粉末状分離大豆蛋白とすることが出来る。

【0021】

以上のように、本発明の方法により、ゲル化力及び乳化力の両者を向上させた分離大豆蛋白の製造が可能となり、これまでの大豆蛋白高物性化の一般的手法であった、乾式・湿式加熱処理や酸沈カード水洗処理といった高コストかつ環境負荷の高い方法を選択せずとも、ソーセージ物性に高物性を反映させることができる大豆蛋白の製造が可能となったものである。

【0022】

次に、本発明の方法により得られた大豆蛋白を用いた肉加工食品の製造法について説明する。即ち、本発明は、前記の方法により製造された大豆蛋白及び肉原料を混合成型し、加熱することを特徴とする肉加工食品の製造法である。具体的には、前記大豆蛋白、肉及び水をブレンドまたは細断しケーシングに充填し加熱して肉加工食品を製造することが出来る。本発明の肉加工食品はソーセージ、フランクフルトまたはその他の肉製品を例示することが出来る。

【0023】

本発明に用いる肉は前記分離大豆蛋白のゲル化力と乳化力を發揮できる鳥獣肉、特に畜肉が適當である。特に好ましい肉材料は、豚肉、牛肉および鶏肉から骨を除いたもの、豚肉切り落とし、牛肉切り落とし、および豚背脂を含む。本発明に用いる肉は、該肉加工食品中に30～70重量%、好ましくは35～50重量%が適當である。

【0024】

本発明に用いる大豆蛋白は前述の方法により製造することが出来る。本発明に用いる大豆蛋白は該肉加工食品中に0.1～10重量%、好ましくは1～5重量%が適當である。

【0025】

本発明に用いる水は畜肉加工食品中20～60重量%、好ましくは25～40重量%添加することが出来る。本発明において、保存料、香味料、または着色料など公知の食品添加物を用いることが出来る。

【0026】

本発明におけるブレンドまたは細断手段はミキサー、サイレントカッターなどの公知の手段を採用することが出来る。本発明に用いるケーシングは公知の食用ケーシングを利用することができる。該ケーシングに充填する手段は公知の練製品充填機などを利用することができます。ケーシングに充填した後加熱処理して目的の畜肉加工食品を得ることが出来る。この加熱は、内部温度60～90℃、好ましくは65℃～80℃にて加熱することが出来る。以上のようにしてソーセージ、フランクフルトなどの肉加工食品を製造することが出来る。

【0027】

以上のようにして得られた肉加工食品に関して、本発明のようにトランスグルタミナーゼ処理と加熱処理をした大豆蛋白を用いた肉加工食品はかかる処理をしない分離大豆蛋白を用いた肉加工食品に比べて本来の食感を損なわず、硬さの有る歯切れの良い食感をもつものである。例えば、得られた肉加工食品をレオナー等で測定したときに、分離大豆蛋白を用いた畜肉加工食品に比べ本発明の大豆蛋白を用いたものはその破断荷重が上昇するものである。

【実施例】

【0028】

以下、実施例により本発明の実施態様を具体的に説明する。

【0029】

(実施例1、2および比較例1～5)

低変性脱脂大豆100重量部に対して、水1000重量部に添加溶解させた抽出水溶液を添加して40℃、30分間抽出を行った。抽出後、遠心分離でオカラを除き脱脂豆乳を得た。これらを塩酸を用いてpH4.5に調整して等電点沈殿させ、遠心分離で酸沈カードを得て、これを加水し水酸化ナトリウムで中和液を得た(実施例1、2、比較例1～3)。また、別途中和の前に酸沈カードに水酸化カルシウムをカード固形量に対し1%添加し、その後水酸化ナトリウムで中和液を得た(比較例4、5)。ここに粗蛋白質1gに対して無添加(比較例1、3、4)及び0.5U(実施例1～2、比較例2、5)のトランスグルタミナーゼ(「TG-Sマイルド」(味の素(株)製)を添加し、50℃×30分反応させた。ここで、直接蒸気加熱処理を140℃×10秒(比較例1、2)、140℃×40秒(実施例1)、155℃×50秒(実施例2、比較例3～5)を実施して噴霧乾燥後、大豆蛋白を得た。

【0030】

得られた大豆蛋白のGlu-Lys結合数、ゲル物性及び乳化性を確認した。Glu-Lys結合数は、「アンモニアテストワコー」(和光純薬(株)製)を使用してアンモニア数を定量し、トランスグルタミナーゼ未反応の数を差し引くことでトランスグルタミナーゼによる遊離アンモニア数とし、Glu-Lys結合数を算出した。ゲル物性は、各大豆蛋白の18%水溶液を80℃×30分加熱した時の加熱ゲル強度をレオメーター(山電社製、プランジャー球直径8mmにて測定したゼリー強度)で評価した。乳化性は、2%食塩を含む1%大豆蛋白溶液4部に大豆油を1部加えてホモゲナイザーにて攪拌させ、この乳化物を500倍に水で希釈して、吸光光度計にて500nmでの吸光度を調べた。

【0031】

(表1)

加熱処理	Glu-Lys結合数	ゼリー強度 (g·cm)	乳化性 (OD500)
------	------------	-----------------	----------------

実施例 1	140°C × 40秒	2.69 × 10 ¹⁸	435.2	0.334
実施例 2	155°C × 50秒	2.80 × 10 ¹⁸	398.2	0.360
比較例 1	140°C × 10秒	—	173.8	0.311
比較例 2	140°C × 10秒	3.01 × 10 ¹⁸	409.0	0.233
比較例 3	155°C × 50秒	—	118.9	0.401
比較例 4	155°C × 50秒	—	168.2	0.224
比較例 5	155°C × 50秒	2.87 × 10 ¹⁸	168.2	0.204

【0032】

表1より強加熱処理のみでは乳化性は上がるもののゲル物性は低下し、トランスグルタミナーゼ処理のみではゲル物性は向上するものの乳化性は低下する。両方の処理を行うことで、ゲル物性と乳化性の両方を向上させることができた。また、カルシウム添加によりトランスグルタミナーゼ処理で物性は回復するものの、乳化性は大きく低下する。

【0033】

前記実施例1、2及び比較例1～3で得られた各粉末状大豆蛋白素材大豆蛋白粉末と豚脂、水を前述の割合であらかじめ混合し、エマルジョンカード（乳化物）を得た。これと、豚ウデ肉、チキンすり身、豚脂、小麦粉および水をそれぞれ5部、20部、25部、15部、5部および30部の割合で混合カッティングし、調味料を添加してさらに混合し、コラーゲンチューブに詰め、65°Cで乾燥、70°Cでくん煙、75°Cで蒸煮を行ってソーセージ（それぞれ試料1、2、3、4及び5）を得た。

【0034】

このようにして得た試料1～5のソーセージをそれぞれ評価した結果を下記表2に示す。食感は10名のモニターにより1～5点（点数が高いほど硬さがある）の5段階評価の官能評価にて行い、全員の点数の平均を算出した（ソーセージが硬く噛み応えのある程点数の高いものとした。）。また、このソーセージのテクスチャーパースペクトラム（T A・X T 2：栄弘精機製）で測定した。

【0035】

（表2）

官能評価（点）	テクスチャーパースペクトラム		
	荷重	凝集性	付着性
実施例 1	3.9	262.1	0.467
実施例 2	4.1	281.3	0.475
比較例 1	2.2	244.1	0.448
比較例 2	1.7	218.3	0.438
比較例 3	2.5	247.0	0.445

【0036】

表2より、特にゲル物性と乳化活性両者を兼ね備えた実施例1、2はソーセージにおいてもその機能を発揮させることができた。

【産業上の利用可能性】

【0037】

本発明により、大豆蛋白のゲル化力と乳化力の両方を向上させることが可能になったものである。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】この発明は、トランスグルタミナーゼを利用してゲル物性及び乳化性両者を向上させる簡便な分離大豆蛋白の製造法を目的とする。

【解決手段】脱脂豆乳又はその酸沈カードをアルカリ金属化合物で中和した物にトランスグルタミナーゼを作用させた後、100°C～200°Cで20秒～80秒加熱することを特徴とする大豆蛋白の製造法。

【選択図】なし。

出願人履歴

0 0 0 2 3 6 7 6 8

19931119

住所変更

大阪府大阪市中央区西心斎橋 2 丁目 1 番 5 号

不二製油株式会社